



TITLE:

Flower color polymorphism in *Hepatica nobilis* var. *japonica* with reference to genetic backgrounds and reproductive success(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Kameoka, Shinichiro

CITATION:

Kameoka, Shinichiro. Flower color polymorphism in *Hepatica nobilis* var. *japonica* with reference to genetic backgrounds and reproductive success. 京都大学, 2019, 博士(人間・環境学)

ISSUE DATE:

2019-03-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21875>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2020-03-24に公開

(続紙 1)

京都大学	博士（人間・環境学）	氏名	亀岡 慎一郎
論文題目	Flower color polymorphism in <i>Hepatica nobilis</i> var. <i>japonica</i> with reference to genetic background and reproductive success (ミスミソウにおける花色多型, 特に遺伝的背景と繁殖成功に関連して)		
(論文内容の要旨)			
<p>生物種の集団内にはしばしば表現型や遺伝子型において様々な多型が見られる場合があり、そのような多型が維持される理由について、様々な仮説が提唱されてきた。一般に、生物の局所的な集団においては、地域の環境条件に起因する純化選択や、集団サイズの縮小とそれに伴う遺伝的浮動によって、集団内多型が排除される傾向がある。集団内において多型が維持される機構を解明することは、進化生物学における一つの重要な課題である。植物には、しばしば花色に多型が見られることがあり、この花色が多型維持機構の研究対象として多く扱われてきた。これは、花色が訪花昆虫を誘引する機能を有するために、検討に適した実験系であると認識されてきたことによる。本論文では、日本列島の北陸地方において集団内に著しい花色多型を有するミスミソウを対象にして、遺伝学的、生理学的、生態学的な解析を行い、集団内に花色多型が維持されているメカニズムを検証したものである。</p> <p>第1章では、まず、赤色・青色・白色ならびにこれらの中間色が集団内に混在する佐渡島の集団を主な対象として集団遺伝構造を解析し、花色ごとの交配の単位を調べた。これには核DNAのマイクロサテライトマーカーを用いた集団遺伝解析を適用した。その結果、様々な花色の間でランダムな交配が起きており、花色と遺伝構造の間に相関がないことが明らかになった。また、太平洋側のミスミソウの集団は白色の花だけを咲かせる。そこで太平洋側の集団も含めて系統地理構造を同様の手法で解析したところ、花色多型を集団内に有する日本海側と、白色の単型である太平洋側は、歴史的に由来が異なることが明らかになった。</p> <p>第2章では、花被片に含有される色素成分を溶媒で抽出して、高速液体クロマトグラフィーで成分を分離し、様々な花色を構成している色素成分を分析した。その結果、ミスミソウの花被片の色素成分は2種のアントシアニンであり、その成分の組み合わせによって3色の花色が現れていた：青（デルフィニジンとシアニジン）、赤（シアニジン）、白（アントシアニンを含有しない）。この結果をもとにして、青色、赤色、白色の花の蕾や花被片で発現している遺伝子をRNA-seqで比較した。そして上記3種類の花色間で発現量が顕著に異なる遺伝子群を検索したところ、<i>F3H</i>, <i>DFR</i>, <i>ANS</i>, <i>F3'H</i>, <i>F3'5'H</i> などの遺伝子が関与していることが判明した。これらの遺伝子は被子植物において広く共有されているアントシアニン合成経路で作用することが知られている遺伝子であり、ミスミソウにおいても共通した経路で花色成分が合成されていることが明らかになった。</p> <p>第3章では、第2章で判明した3種類の花色タイプにおける訪花昆虫相と、花被片の</p>			

食害の程度を検証した。その結果、最も訪花頻度の高い昆虫は、ハムシ科やケシキスイ科を含む甲虫類であり、色素を含んだ有色花よりも、白花を好んで訪花していた。また、甲虫類は体に花粉をつけながら、同時に花器官である花被片や雄蕊、雌蕊の摂食行動も行っていたことから、送粉者であると同時に、食害者でもあることが示唆された。

第4章では、繁殖成功度に関わる生態的要素を測定して、少数派の適応度が多数派よりも高くなるような「負の頻度依存選択」と、食害と送粉が絡むような利益相反に関わる自然選択である「拮抗的自然選択」のどちらがミスミソウの繁殖成功に寄与しているかを検証した。集団内の花色頻度と繁殖成功度の間に負の相関が検出されれば、負の頻度依存選択が働いている可能性がある。また、拮抗的自然選択が働いている場合、花被片に食害を受けた個体では、花被片の面積と繁殖成功度の間に正の相関が検出されるはずである。これらの仮説のもと、繁殖成功度に関わる要素を測定し、一般化線形混合モデルによる解析を行った。その結果、集団内の花色頻度と繁殖成功度の間には有意な相関は検出されなかった。一方で、食害を受けた花の残存花被片面積と繁殖成功度の間には正の相関があり、拮抗的自然選択が働いている可能性が示された。

本研究の結果から、ミスミソウにおける3種類の花色多型の繁殖成功度には、甲虫類による、送粉と食害に関わる拮抗的自然選択が働いている可能性が示唆された。この選択圧は特に白花の適応度を抑えるため、フィードバック効果によって白色に単型化するのを防いでいると推測される。このような拮抗的な自然選択に、甲虫類における訪花数の年変動や、集団間の遺伝子流動などが関わることで、花色多型が維持されている可能性を指摘した。

(論文審査の結果の要旨)

一般に、発芽した場所から移動することができない植物では、局所集団の花色や葉の形態などの表現型が特定のものに固定する現象が多く見られる。これは生育場所の環境要因に起因する純化選択が働いたり、集団サイズの縮小とそれに伴う遺伝的浮動が働くことによって、集団内多型が排除されることに拠ると考えられてきた。しかし、集団内に様々な変異が保持される場合もあり、そのような多型が維持される理由については様々な仮説が提唱され、実験による検証が行われてきた。本研究も、この集団内多型の維持機構について検証を試みたものであり、花色の集団内多型を扱った。研究対象にしたのは、ミスミソウの北陸地方の集団であり、狭い面積の局所集団の中に青、赤、白、そしてこれらの中間色が混在する。本研究は、集団内で花色多型がどのような頻度で出現するのか調査したうえで、異なる花色の間で交配が起きているのかを検証した。そして花色色素成分の分析と色素合成に関わる遺伝子の発現解析を行い、様々な花色が生じる現象を遺伝子の発現レベルで説明している。さらに生態学的な観察手法を使って、花色ごとの繁殖成功について検討を行い、ミスミソウの局所集団の中に花色多型が維持され続けている機構を考察したものである。

この研究ではまず、佐渡島の集団を主な対象として、様々な局所集団にて花色頻度を調べている。その結果、赤色・青色・白色ならびにこれらの中間色が集団内に混在すること、花色頻度では青色が最も少なく、白または赤が多い傾向がみられた。引き続き、集団遺伝構造を解析し、花色ごとの交配の単位を調べている。これには核DNAのマイクロサテライトマーカーを用いた集団遺伝解析を適用した。その結果、様々な花色の間でランダムな交配が起きており、花色と遺伝構造の間に関係性がないことが明らかになった。ミスミソウの集団内に生じる様々な花色間の交配様式は、それまで欧米でも関心は持たれてきたが検証がされず、これが初めての知見である。また、太平洋側においてミスミソウは白色の花だけを咲かせる。太平洋側の集団も含めた系統地理構造の解析では、花色多型を集団内に有する日本海側と、白色の単型である太平洋側が遺伝的に分化していることが明らかになった。これは第四紀の最終氷期と後氷期を主とした分布域変遷を反映していることを示唆しており、日本列島における温帯生植物が辿った歴史の解明に寄与するものである。

ミスミソウの花色を構成している色素の種類はアントシアニン系の物質であるが、様々な色調を作り出す成分の構成については不明であった。本研究では花被片に含有される色素成分の分析を試みている。その結果、ミスミソウの花被片の色素構成はわずかに3パターンだけであり、青色、赤色、白色の花はデルフィニジンとシアニジンの色素成分の有無や組み合わせで決定されていた。ミスミソウの花色多型は、様々な中間色をもつことが大きな特徴であるが、少数の色素の簡単な組み合わせで説明できたことは興味深い知見である。この結果をもとにして、青色、赤色、白色の花の蕾や花被片で発現している遺伝子の特定と発現量の多寡をRNA-seqで比較した。そして上記3つの花色間で発現量が顕著に異なる遺伝子群を検定したところ、被子植物において広く共有されているアントシアニン合成経路で作用する遺伝子が関与していることが判明した。色素成分と発現している遺伝子の種類の関係は一致しており、3種類に大別される花色を決定している色素種と発現遺

伝子が特定された。青色の花色形成にはもっとも多く色素種と遺伝子の関与が必要であり、逆に白色の花は色素合成することなく低コストで形成されていることが明らかになった。集団内花色多型の研究において、遺伝子の発現レベルまで踏み込んだ研究はこれまでになく、本研究における新たな知見の一つである。

花色多型の維持機構を考えるうえで、花色ごとの訪花昆虫相と繁殖成功を調べることは重要である。本研究では上記の知見を受けて、3つの花色タイプにおける訪花昆虫相と、結実の程度を検証している。当初はハナバチやアブなどが訪花することを想定して、これらの昆虫がミスミソウの花色多型を識別できるかどうか推定しているが、この予想は外れて、ハムシ科やケシキスイ科を含む甲虫類の訪花頻度が最も高いことを示した。甲虫類は送粉と同時に花器官の摂食行動も行っていたことから、食害者でもあることが示唆された。このように本研究では訪花昆虫相と繁殖成功を考察するうえで、食害と送粉の両方の効果をもたらす甲虫類が重要な役割を果たしていることが明らかにされた。色素を含んだ有色花よりも、白花を好んで訪花していたことは、アントシアニン系の色素が甲虫の食害への忌避物質である可能性を示唆しており、とても興味深い知見を提供している。

研究のまとめでは、繁殖成功度に関わる様々な環境要素の測定や形態情報の取得を行って、少数派の適応度が多数派よりも高くなるような「負の頻度依存選択」と、食害と送粉が絡むような利益相反に関わる自然選択である「拮抗的自然選択」のどちらがミスミソウの繁殖成功に寄与しているかを検証した。その結果、集団内の花色頻度と繁殖成功度の間には有意な相関は検出されなかった。一方で、食害を受けた花の残存花被片面積と繁殖成功度の間には正の相関があり、花色に拮抗的自然選択が働いている可能性が示された。この機構においては、食害防御物質であるアントシアニンを含有しない白花の適応度を抑えるため、フィードバック効果によって白色に単型化するのを防いでいると推測される。このように、ミスミソウに見られる花色多型が維持される機構に、訪花昆虫による送粉と食害、有色花の形成による食害回避が関わっていることは、新規性に富む知見である。

このように本研究は、系統地理学や集団遺伝学、生化学、遺伝学、生態学などの様々な手法を駆使した緻密なデータをもとにして、植物集団内における花色多型の維持機構について重要な知見を与えるものである。これらの成果の多くは、国際誌に掲載されている。本研究の成果は、関連環境学専攻自然環境動態論講座の目的の一つである、生物多様性をもたらす機構の解明に貢献するものであり、本研究は同講座にふさわしい内容をそなえたものと言える。

よって、本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成31年1月16日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、著作権に係る制約がなくなるまでの間、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日：平成 年 月 日以降